



TITLE:

縫線核セロトニン神経活動性の薬  
理学的調節機構の解明(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

浅岡, 希美

---

CITATION:

浅岡, 希美. 縫線核セロトニン神経活動性の薬理的調節機構の解明. 京都大学, 2018, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21055>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2018-04-01に公開

|   |                           |     |       |
|---|---------------------------|-----|-------|
| 京都大学  | 博 士（ 薬 学 ）                | 氏 名 | 浅岡 希美 |
| 論文題目  | 縫線核セロトニン神経活動性の薬理学的調節機構の解明 |     |       |
| <p>縫線核セロトニン神経は、情動や認知といった幅広い脳機能に関与し、その機能変化は様々な精神疾患の原因となる。このためセロトニン神経系を標的とした精神疾患治療薬は多いが、効果発現の遅さや奏効率の低さといった課題を抱えている。こうした課題を克服するためにも、精神疾患治療薬の作用機構を明らかにする必要がある。本研究では、未だ詳細が明らかとなっていない縫線核セロトニン神経自体の活動性調節機構に焦点を当て、その薬理学的な調節について検討を行った。</p> <h3>第 1 章 HDAC阻害薬による縫線核セロトニン神経機能の亢進</h3> <p>ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬はエピジェネティックな遺伝子発現調節により抗うつ・抗不安作用を示し、精神疾患治療への応用が期待されている。エピジェネティックな効果発現には持続的なHDAC阻害薬の適用が必要であるが、セロトニン神経を長期間安定に培養することは難しいことからHDAC阻害によるセロトニン神経機能変化については未解明であった。そこでHDAC阻害薬の持続適用が縫線核セロトニン神経機能に与える影響について、<i>in vivo</i>様の局所出入力関係を残したままセロトニン神経の長期間安定培養が可能な縫線核含有中脳切片培養系を用いて検討した。ラット新生児脳より作成した中脳培養切片にHDAC阻害薬トリコスタチンA(TSA)を処置すると、処置2日目以降でセロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素2(TPH2)遺伝子発現の上昇を介してセロトニン組織含有量が増加した。また、TSAはセロトニン遊離量も増加させたが、この作用は処置2日目では出現せず、処置4日目に初めて有意な増加を示した。このセロトニン遊離促進作用はグルタミン酸入力に起因する神経活動依存的なものであり、AMPA受容体サブユニットの1つであるGluA2遺伝子およびAMPA受容体の機能調節に関与するCaMKII<math>\alpha</math>遺伝子の発現量がいずれも増加していた。さらにTSAのセロトニン合成促進作用はCaMKII非依存的であったが、セロトニン遊離促進作用はCaMKIIシグナル依存的であったことから、TSAはTPH2発現上昇を介したセロトニン合成促進とCaMKIIシグナルを介した興奮性入力の増加という2つの機構を介してセロトニン神経機能を亢進させることが明らかとなった。</p> <h3>第 2 章 オランザピンによる縫線核セロトニン神経の局所抑制回路の調節</h3> <p>選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)はうつ病の第一選択薬であるが治療抵抗性の患者も多く存在する。こうした患者に対し、SSRIと抗精神病薬の併用による増強療法、中でもSSRIとオランザピンの併用は有効な治療法となることが報告されている。しかしながら、オランザピンのような多受容体作用型薬物との併用は副作用リスクの増大にもつながるため、安全な治療法開発のためには増強療法におけるオランザピンの作用機構の解明が必要である。そこでオランザピンによる治療効果増強機構について検討を行った。縫線核含有中脳培養切片において、オランザピンは5-HT<sub>6</sub>受容体の遮断を介してセロトニン遊離を促進し、この</p> |                           |     |       |

作用はSSRIの併用で相乗的に増強された。また、GABA<sub>A</sub>受容体遮断条件下ではセロトニン遊離促進作用は消失したことから、オランザピンの作用には抑制性入力の変化が関与することが示唆された。そこでマウス急性単離脳切片を用いて single-cell PCRによる遺伝子発現解析と電気生理学的な神経活動性記録を行った。その結果、背側縫線核GABA神経に5-HT<sub>6</sub>受容体が発現しており、オランザピン処置および5-HT<sub>6</sub>受容体遮断によりGABA神経活動が低下し、セロトニン神経活動が亢進した。さらに、尾懸垂試験による抗うつ作用評価において、5-HT<sub>6</sub>受容体遮断薬はSSRIの作用を増強した。以上の結果より、オランザピンはGABA神経上の5-HT<sub>6</sub>受容体を遮断し、GABA神経活動を低下させることでセロトニン神経の脱抑制を引き起こし、SSRIの抗うつ作用増強に寄与することが明らかとなった。一方、背側縫線核内の局所回路においてはCB<sub>1</sub>受容体を介した活動依存的な伝達抑制機能は弱く、背側縫線核セロトニン神経の活動性にはGABA性のフィードバック抑制がより強く影響する可能性が示唆された。

### 第3章 SSRI長期投与による縫線核セロトニン神経の自発発火能の亢進

セロトニン神経は生体内において一定の遅いリズムで持続的に活動している。この特徴的な活動はセロトニン神経自身の自発活動能に由来すると考えられているが、*ex vivo*条件ではセロトニン神経活動の記録は難しく、グルタミン酸やノルアドレナリンによる縫線核外からの興奮性入力がセロトニン神経活動に必須であるとの実験的知見が大多数であった。しかし、本研究では独自の記録手法を用いることで*ex vivo*での自発的なセロトニン神経活動の電気生理学的記録を可能とした。本記録条件において、背側縫線核セロトニン神経は*in vivo*記録と同程度の自発発火活動を示し、その活動はグルタミン酸やノルアドレナリン入力を遮断した条件下でも持続した。また、記録中のセロトニン神経でのみL型VDCCを遮断すると神経活動が大幅に減少したことから、自発活動性関連チャネル群のうち、L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル(VDCC)がセロトニン神経の自発活動性制御に強く関与していることが示唆された。さらに、セロトニン神経のL型VDCC機能および自発発火能は、protein kinase A (PKA)活性化によって正に調節されており、GABA<sub>B</sub>受容体は持続的なPKA抑制によってセロトニン神経活動を負に調節していることが明らかになった。さらに、臨床使用時と同様の長期間のSSRI投与がこの活動性調節機構に与える影響を検討したところ、SSRI長期投与はセロトニン神経のGABA<sub>B</sub>受容体シグナルを低下させることで、PKA依存的にL型VDCC機能および、セロトニン神経の自発活動性を亢進させることが明らかとなった。

以上、本研究より縫線核セロトニン神経の生理的な活動制御メカニズムと精神疾患治療薬による活動調節機構の一端が明らかとなった。対象とした治療薬によって作用機構は異なるものの“縫線核セロトニン神経の活動性亢進”という表現型は共通であり、その重要性が強く示唆される。本研究成果は精神疾患治療薬開発に新たな戦略をもたらし得るものである。

(論文審査の結果の要旨)

縫線核セロトニン神経は、情動や認知といった幅広い脳機能に関与し、その機能変化は様々な精神疾患の原因となる。このためセロトニン神経系を標的とした精神疾患治療薬は多いが、効果発現の遅さや奏効率の低さといった課題を抱えている。こうした課題を克服するためにも、精神疾患治療薬の作用機構を明らかとする必要がある。申請者は、未だ詳細が明らかとなっていない縫線核セロトニン神経自体の活動性調節機構に焦点を当て、その薬理学的な調節について検討を行った。

## 第1章 HDAC阻害薬による縫線核セロトニン神経機能の亢進

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬はエピジェネティックな遺伝子発現調節により抗うつ・抗不安作用を示し、精神疾患治療への応用が期待されている。エピジェネティックな効果発現には持続的なHDAC阻害薬の適用が必要であるが、セロトニン神経を長期間安定に培養することは難しいことからHDAC阻害によるセロトニン神経機能変化については未解明であった。そこで申請者はHDAC阻害薬の持続適用が縫線核セロトニン神経機能に与える影響について、*in vivo*様の局所出入力関係を残したままセロトニン神経の長期間安定培養が可能な縫線核含有中脳切片培養系を用いて検討した。

ラット新生児脳より作成した中脳培養切片にHDAC阻害薬トリコスタチンA(TSA)を処置すると、処置2日目以降でセロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素2(TPH2)遺伝子発現の上昇を介してセロトニン組織含有量が増加した。また、TSAはセロトニン遊離量も増加させたが、この作用は処置2日目では出現せず、処置4日目に初めて有意な増加を示した。このセロトニン遊離促進作用はグルタミン酸入力に起因する神経活動依存的なものであり、AMPA受容体サブユニットの1つであるGluA2遺伝子およびAMPA受容体の機能調節に関与するCaMKII  $\alpha$  遺伝子の発現量がいずれも増加していた。さらにTSAのセロトニン合成促進作用はCaMKII非依存的であったが、セロトニン遊離促進作用はCaMKIIシグナル依存的であったことから、TSAはTPH2発現上昇を介したセロトニン合成促進とCaMKIIシグナルを介した興奮性入力の増加という2つの機構を介してセロトニン神経機能を亢進させることが明らかとなった。

## 第2章 オランザピンによる縫線核セロトニン神経の局所抑制回路の調節

選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)はうつ病の第一選択薬であるが治療抵抗性の患者も多く存在する。こうした患者に対し、SSRIと抗精神病薬の併用による増強療法、中でもSSRIとオランザピンの併用は有効な治療法となることが報告されている。しかしながら、オランザピンのような多受容体作用型薬物との併用は副作用リスクの増大にもつながるため、安全な治療法開発のためには増強療法におけるオランザピンの作用機構の解明が必要である。そこで申請者はオランザピンによる治療効果増強機構について検討を行った。

縫線核含有中脳培養切片において、オランザピンは5-HT<sub>6</sub>受容体の遮断を介してセロトニン遊離を促進し、この作用はSSRIの併用で相乗的に増強された。また、GABA<sub>A</sub>受容体遮断条件下ではセロトニン遊離促進作用は消失したことから、オランザピンの作用には抑制性入力の変化に関与することが示唆された。そこでマウス急性単離脳切片を用いてsingle-cell PCRによる遺伝子発現解析と電気生理学的な神経活動性記録を行った。その結果、背側縫線核GABA神経に5-HT<sub>6</sub>受容体が発現しており、オランザピン処置および5-HT<sub>6</sub>受容体遮断によりGABA神経活動が低下し、セロトニン神経活動が亢進した。さらに、尾懸垂試験による抗うつ作用評価において、5-HT<sub>6</sub>受容

体遮断薬はSSRIの作用を増強した。以上の結果より、オランザピンはGABA神経上の5-HT<sub>6</sub>受容体を遮断し、GABA神経活動を低下させることでセロトニン神経の脱抑制を引き起こし、SSRIの抗うつ作用増強に寄与することが明らかとなった。一方、背側縫線核内の局所回路においてはCB<sub>1</sub>受容体を介した活動依存的な伝達抑制機能は弱く、背側縫線核セロトニン神経の活動性にはGABA性のフィードバック抑制がより強く影響する可能性が示唆された。

### 第3章 SSRI長期投与による縫線核セロトニン神経の自発発火能の亢進

セロトニン神経は生体内において一定の遅いリズムで持続的に活動している。この特徴的な活動はセロトニン神経自身の自発活動能に由来すると考えられているが、*ex vivo*条件ではセロトニン神経活動の記録は難しく、グルタミン酸やノルアドレナリンによる縫線核外からの興奮性入力にセロトニン神経活動に必須であるとの実験的知見が大多数であった。そこで申請者は、独自の記録手法を用いることで*ex vivo*での自発的なセロトニン神経活動の電気生理学的記録を可能とした。

本記録条件において、背側縫線核セロトニン神経は*in vivo*記録と同程度の自発発火活動を示し、その活動はグルタミン酸やノルアドレナリン入力を遮断した条件下でも持続した。また、記録中のセロトニン神経でのみL型VDCCを遮断すると神経活動が大幅に減少したことから、自発活動性関連チャネル群のうち、L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル(VDCC)がセロトニン神経の自発活動性制御に強く関与していることが示唆された。さらに、セロトニン神経のL型VDCC機能および自発発火能は、protein kinase A (PKA)活性化によって正に調節されており、GABAB受容体は持続的なPKA抑制によってセロトニン神経活動を負に調節していることが明らかになった。さらに、臨床使用時と同様の長期間のSSRI投与がこの活動性調節機構に与える影響を検討したところ、SSRI長期投与はセロトニン神経のGABAB受容体シグナルを低下させることで、PKA依存的にL型VDCC機能および、セロトニン神経の自発活動性を亢進させることが明らかとなった。

以上、申請者は縫線核セロトニン神経の生理的な活動制御メカニズムと精神疾患治療薬による活動調節機構の一端を明らかにした。対象とした治療薬によって作用機構は異なるものの“縫線核セロトニン神経の活動性亢進”という表現型は共通であり、その重要性が強く示唆される。本研究の成果は精神疾患治療薬開発に新たな戦略をもたらし得るものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 平成30年 4月 1日以降